体外診断用医薬品
製品番号 6604120

**2009 年 11 月改訂
*2007 年 2 月改訂
承認番号 21800AMY10099000

日本標準商品分類番号
877449

*CALLA 発現細胞キット サイトスタット J5-RD1

ご使用に際しては、本添付文書をよくお読みください。

全般的な注意

1. 本品は、体外診断用でありそれ以外の目的に使用しないでください。
2. 診断は他の関連する検査結果や臨床症状等に基づいて総合的に判断してください。
3. 添付文書等に記載した内容以外の方法で使用した場合には、保証しません。
4. ご使用にあたっては、測定装置の取扱説明書をよく読んでから使用してください。

形状・構造等（キットの構成）

構成試薬名	成分	分量
モノクローナル抗体試薬		
	フィコエリスリン結合抗ヒト CD10 マウスモノクローナル抗体 J5	0.69μg/テスト

＊フィコエリスリン: RD1 と略記

抗体以外の各種成分と濃度
1 バイアル（0.5mL）中

BSA	: 0.2%
リン酸カリウム	: 0.01M
NaCl	: 0.15M
NaN_3	: 0.1%
スタビライザー	

【対象抗原】

CD10（分子量 100kDa）

CD10 は分化前のリンパ球前駆細胞に発現します。細胞がＴ細胞系統に分化するとCD10 の発現が消失します。B 細胞系統の場合はさらに遅く、細胞が表面免疫グロブリンを発現するころに消失します。増殖、活性化している胚中心の B 細胞、正常骨髄細胞の一部や末梢血の好中球にも発現し、造血系以外では、腎臓の糸球体上皮、乳腺の筋上皮などで発現がみられます。

【クローン】

J５；CALLA 陽性の非Ｔ細胞性 ALL 患者から得られた腫瘍細胞で免疫した BALB/cJ マウスの脾臓細胞と、マウスの NS/1-AG4 細胞との融合細胞から分離

【Ig 構造】

マウス IgG2a

【細胞毒性】

補体依存性

【原料及び精製法】

マウス腹水よりアフィニティクロマトグラフィで精製

【標識】

RD1（Phycoerythrin）
RD1／抗体タンパク比＝0.5～1.5
励起波長 485～490nm、蛍光波長 570～590nm

使用目的

ヒト白血球表面抗原（CD10 陽性細胞）の分類および陽性率の測定

測定原理

フローサイトメトリーによる直接免疫蛍光法
測定には、488nm で励起し、575nm の蛍光を検出できるフローサイトメーターが必要です。

操作上の注意

1. 本製品は全血検体用に調製されており、新鮮または凍結保存した分離単核球検体への使用は不適当です。
2. 凍結検体のバイアビリティは 85%以上としてください。
3. 抗凝固剤としては、EDTA、ヘパリン等を用いることができるが、いずれの場合でも採血後は室温で保存し、6 時間以内に染色することをお薦めします。特に白血病細胞等では、保存によって急激に陽性率の低下をきたす場合があるので注意してください。染色後は、固定した場合 24 時間以内、固定していない場合 2 時間以内に測定してください。
4. 末梢血検体の場合、細胞のバイアビリティ（生残率）は 90%以上が理想的ですが、異常検体ではこれを下回ることがあります。白血病細胞などでは、保存により急激に生残率の低下を来たす場合があるため、注意が必要です。
5. 白血病検体など白血球数が 10,000 個/mm^3 を超える検体は、同一患者の血漿を用いて白血球数が 10,000 個/mm^3 以下になるように希釈してください。
6. 全血法によるサンプル処理では、赤血球の溶血残渣や溶血されなかった赤血球が誤差要因となるので、溶血操作を確実に行ってください。試験管上部壁面に付着した血液飛沫は溶血操作の前に綿棒等で除去してください。
7. タンパク濃度が異常な場合や、有核赤血球、ヘモグロビン合成異常では赤血球の溶血が不完全となることがあります。この場合、溶血していない赤血球がリンパ球としてカウントされるために陽性率が実際よりも低くなるおそれがあるので十分に注意してください。
8. 溶血時間が長いと、白血球にもダメージが及ぶ場合があります。
9. 単球系の細胞は他の白血球に比べて抗体タンパクの非特異的な結合が著しいため、できるだけ対照には CYTO-STAT®/COULTER CLONE ® MSIgG2a-RD1 などの陰性コントロール抗体試薬を使用してください。
10. フローサイトメーターのレーザ光軸の調整不良や感度及びゲートの不適切な設定により、誤った結果が得られる場合があります。
11. 白血病細胞など抗原の発現量に異常がみられる場合や溶血残渣が多く測定が困難な場合は、すべての試験管に PBS を 3mL 加えて 400～450×g で 5 分間遠心分離し、上清を除去した後、沈渣を適量の PBS に再浮遊させてから測定すると解析が容易になります。

用法・用量（操作方法）

【試薬の調製】

モノクローナル抗体はそのまま使用します（10μL/テスト）。

【その他必要な試薬】

1. 溶血試薬（イムノプレップ試薬システム）
   製品番号 7546999 容量 300 テスト（TQ-Prep、Multi-Q-Prep 用）
   製品番号 7546946 容量 100 テスト（Q-Prep 用）

   イムノプレップ試薬システムは、自動サンプル処理装置専用の溶血固定試薬で、以下の試薬から構成されています。

   a) イムノプレップ A（溶血試薬）
   b) イムノプレップ B（反応停止試薬）
   c) イムノプレップ C（固定試薬）

   注）コールター全血ライジングキット（製品番号 6603152）など、他の溶血試薬を用いる場合は、溶血試薬の添付文書に従って調製、使用してください。

2. PBS（リン酸緩衝生理食塩水（溶血後に洗浄が必要な場合に使用）
   PBS バッファ（製品番号 6603369）1 パックを蒸留水 500mL に溶解します。調製後のpH は 7.2±0.2 で、防腐剤等は含んでいません。

3. 陰性コントロール試薬（アイソタイプコントロール抗体）
   CYTO-STAT/COULTER CLONE MsIgG2a-RD1
   製品番号 6603855 容量 50 テスト（0.5mL）

【検体の採取と白血球数の調整】

検体には、抗凝固剤（EDTA 推奨）を用いて採血した末梢血を使用します。試験管１本につき 100μLの血液を用いるため、測定項目数＋対照の試験管分と検体希釈用の自己血漿採取分として、通常 1 検体につき 1～2mL の血液が必要です。

白血球数が 3～10×10^3 個/mm^3 であることが染色を行ううえで望ましく、検体中の白血球数がこの範囲を外れる場合には、希釈*またはバフィーコート法などにより濃縮して白血球数を調整してください。

また、採決後の検体を保存する場合は室温（20～25℃）で保存し、できるだけ採血後 6 時間以内に操作を開始してください。

* 溶血試薬にイムノプレップ試薬システムを用いる場合は、検体の希釈や白血球数の調整には同一患者検体の血漿（自己血漿）を用いてください。

(参考： 白血球数の調整法)

a) 白血球数が多い検体の場合（＞10×10^3 個/mm^3）

白血球数	希釈倍数		
10～20	×10^3	:	2 倍
20～30	×10^3	:	3 倍
30～40	×10^3	:	5 倍
40～60	×10^3	:	6 倍
60～100	×10^3	:	10 倍
100～200	×10^3	:	20 倍

b) 白血球数が少ない検体の場合（＜3×10^3 個/mm^3）

バフィーコート法

(1) 検体を 25℃で 500×g、5 分間遠心分離します。
(2) 白血球の層をパスツールピペットで採取します。この際、すべての白血球を確実に回収するため赤血球及び血漿も一部回収します。
(3) 数回ピペッティングして、十分に懸濁させます。
(4) コールターLH700 シリーズ等のヘマトロジーアナライザーや血球計算板を用いて細胞濃度を測定します。
(5) 自己血漿で細胞濃度を 3～10×10^3 個/mm^3 に調整します。

【操作方法】

溶血試薬にイムノプレップ試薬システムを用いる方法（Q-Prep™ 法）

注）イムノプレップ試薬システム以外の溶血試薬を用いる場合は、溶血試薬の添付文書に従って操作してください。

1. テスト用と対照用に 12mmφ×75mm の試験管を用意します。
2. それぞれの試験管に全血 100μL を分注します。管壁に付着した血液は綿棒等で拭き取ってください。
3. モノクローナル抗体試薬 10μL をテスト用の試験管に加えます。対照用の試験管にはコントロール試薬（CYTO-STAT®/COULTER CLONE® MSIgG2a-RD1、別売）を 10μL 加えます。
4. よく撹拌した後、室温で 10 分間反応させます。
5. 試験管を TQ-Prep™（または Q-Prep）で溶血・固定処理します。

   注 1） ベックマン・コールター社製フローサイトメーター以外の装置（前方散乱光を狭角で検出する装置）で測定する場合は、溶血後に脱イオン水または蒸留水を 0.5mL 加えてください。
   注 2） 白血病細胞など抗原の発現強度に異常がみられる検体を測定する場合は、【操作上の留意事項】の 11)を参照してください。

6. フローサイトメーターで測定します。
   調製したサンプルは、室温で２時間まで保存できます。２時間を超える場合は、2～8℃で遮光保存し、調製後 24 時間以内に測定してください。

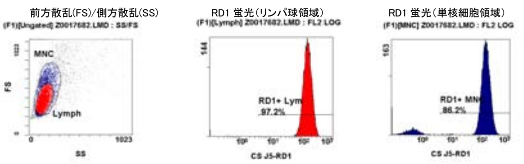
測定結果の判定方法

1. 正しく調整されたフローサイトメーターを使用してください。
2. 前方散乱光（FS）と側方（90°方向）散乱光（SS）のサイトグラム上で明瞭な白血球 3 分画（リンパ球、単球、顆粒球）が得られるように FS のスレッショルドと散乱光のゲインを確認、調整します。
3. 白血球領域全体及びリンパ球、単球など任意の白血球集団に解析ゲートを設定し、RD1 蛍光（Log スケール）の 1 パラメータ蛍光ヒストグラムを取得します。対照用のサンプルで蛍光陽性領域を設定します。

【ヒストグラム例】

本製品による陽性検体測定ヒストグラム例

フローサイトメーター： EPICS® XL™



正常末梢血において、CD10 はリンパ球と単球には発現しないが、顆粒球には弱く発現しています。

自社施設において本製品で健常者末梢血全血（n＝20）を測定したとき、単核細胞領域の CD10 陽性率の平均値及び標準偏差は、5.6±0.8%でした。

【判定上の注意】

1. 単球および単球由来の白血病細胞は、抗体試薬の非特異的な結合が起こりやすいので、結果の判定に際してとくに注意が必要です。
2. 顆粒球は CD10 を弱く発現しているので、解析ゲート内に顆粒球が混入しないように注意してください。
3. FITC 標識抗体より RD1 標識抗体の方が抗体 1 分子あたりの蛍光量が強いため、上記の諸点については、RD1 標識抗体でより影響が大きいです。このため、同一検体で本製品の陽性率よりサイトスタット J5−RD1 の陽性率の方が高いことがあります。また、相関検討に用いた J5−RD1 の既承認品の陽性率に比して本製品の陽性率が低いことがあります。
4. 本製品の結果は解析ゲート中の白血病細胞の割合に依存するため、予め血球形態検査などで白血球中に占める白血病細胞の比率を把握しておき、解析ゲートを設定する際、及び測定結果を解釈する際の参考にしてください。
5. 血球中に占める白血病細胞の比率は検体によって異なるため、測定結果の解釈にあたり、全ての検体に画一的なカットオフ陽性率を設定することは望ましくないと考えられます。
6. 顆粒球は CD10 を弱く発現しているので、解析ゲート内に顆粒球が混入しないように注意します。
7. また、RD1 標識抗体に対し RD1（フィコエリスリン；PE）標識抗体は蛍光強度が高く非特異的結合の影響が強く出るため、RD1 標識抗体での参考正常値と RD1（フィコエリスリン；PE）標識抗体での正常値は、後者で高く設定されるので、参考正常値は必ず各測定法毎に設定してください。（同一の参考正常値は使用できません）

【測定条件の確認】

健常者の末梢血などを用いて、フローサイトメーターの設定やゲーティングなどの測定条件の正確性を確認できます。

検体ごとに抗体の非特異的な結合を確認するため、適切なアイソタイプコントロール試薬（CYTO-STAT®/COULTER CLONE® MSIgG2a - RD1）を用います。健常者検体の場合、コントロール試薬の陽性率は通常 1～2%となります（2%を上回る場合、測定結果は誤差を含んでいるおそれがある）が、腫瘍検体ではより高い値を示すことがあります。

臨床的意義

リンパ球、単球、顆粒球など白血球の亜集団は、その細胞系統や分化成熟段階に、あるいは機能的サブセットに特有の細胞表面抗原を有しており、それらの発現を利用することによって同定が可能です。

また、血液細胞の腫瘍である白血病／リンパ腫の細胞系統を調べるには、形態学的情報及び細胞化学染色、遺伝子再構成の検出、染色体異常の検出などとともに、細胞表面抗原の分析が非常に有用です。特に、リンパ系腫瘍の分類や、骨髄系腫瘍でも形態的な判別が困難な場合には、細胞表面抗原の分析は欠くことのできないものとなっています。

本製品は、non−T 細胞性急性リンパ芽球性白血病（non−T ALL）に高率にみられる CD10 抗原を検出するモノクローナル抗体です。CD10 抗原は、Common Acute Lymphoblastic Leukemia Antigen（CALLA）として知られる分子量 100kDa のⅡ型膜蛋白で、機能的にヒトの膜結合型中性エンドペプチターゼとしても同定されています。CD10 は、プレ B 細胞などリンパ球前駆細胞に発現します。CD10 は、プレ B 細胞などリンパ球前駆細胞に発現するため、本製品は CALLA を発現する non−T 細胞性または T 細胞性白血病の同定に有用です。

性能

【特異性】

本製品 J5 モノクローナル抗体は、白血球分化抗原に関する国際ワークショップにおいて CD10 のリファレンスモノクローナル抗体として認定されています。

用法用量欄の操作法によりフローサイトメーターを用いて感度、特異性、再現性の各試験を行うとき、下記の規格値に適合します。

CD10 陰性の細胞株で特異性の確認が行われた既承認のモノクローナル抗体で CD10 陽性細胞の割合（以下 CD10 陽性率）を求めたヒト全血検体もしくは性能の各試験の規格に適合した有効期限内の本製品のロット（以下自社参照ロット）で CD10 陽性率を求めたヒト全血検体（単球の占める割合が 5～11%、白血球数が 10,000 個／μL 以下）を管理検体としたとき、以下の規格を満足します。

【感　度】

ア） 正常末梢血（CD10 陽性率低値）を3回測定するとき、CD10 陽性細胞分画の平均蛍光強度は、自社参照ロットを用いて得られる CD10 陽性細胞分画の平均蛍光強度値の 14%低値に相当する値より大きい。

イ） CD10 陽性細胞株培養液（CD10 陽性率高値）を 3 回測定するとき、CD10 陽性細胞分画の平均蛍光強度は、自社参照ロットを用いて得られる CD10 陽性細胞分画の平均蛍光強度値の 14%低値に相当する値より大きい。

【特異性】

ア） 正常末梢血（CD10 陽性率低値）を3回測定するとき、CD10 陽性率は自社参照ロットを用いて得られる陽性率±5%以内です。

イ） 正常末梢血顆粒球（CD10 陽性率中程度）を3回測定するとき、CD10 陽性率は自社参照ロットを用いて得られる陽性率±5%以内です。

ウ） CD10 陽性細胞株培養液（CD10 陽性率高値）を 3 回測定するとき、CD10 陽性率は自社参照ロットを用いて得られる陽性率±5%以内です。

【再現性試験】

正常末梢血顆粒球（CD10 陽性率中程度）を3回以上測定するとき、CD10 陽性率の CV（変動係数）は 5%以下です。

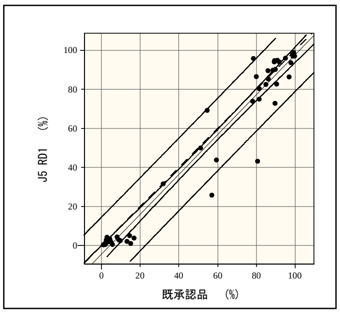
【測定範囲または最小検出感度】

測定範囲： 2～100%

【相関性】

本製品と既承認品との相関性は、以下のとおり良好でした。

CD10 陽性率（%）： y＝ 1.021x－4.435　r＝ 0.9763 （n＝50）



既存品は本品に対し高めの測定値を示していることから、非特異的な反応を受けやすいことが示唆されました。回帰直線の下方に信頼度曲線を逸脱して分布が見られる 2 つの検体は、ALL の検体であり、ALL ではより強く非特異的な反応がみられる場合があることが示唆されました。

使用上または取扱上の注意

1. 本製品はフローサイトメトリー専用試薬です。蛍光顕微鏡には使用できません。
2. 本製品にはアジ化ナトリウムが含まれています。アジ化ナトリウムは酸性下で有毒なアジ化水素酸を産生しますので、取り扱いに十分注意してください。また、アジ化物が金属製の配水管内に蓄積することによる爆発の危険性を避けるため、アジ化物の廃棄は多量の流水で希釈しながら行ってください。
3. 有効期限を過ぎた試薬を使用しないでください。
4. 検体及び検体に触れた器具類は感染の危険性があるものとして取り扱い、適切な表示、処理の後に廃棄してください。
5. ピペットを口で吸引しないでください。また、皮膚や粘膜への検体の接触を避けてください。
6. 保管及びインキュベーション中に試薬を強い光にさらさないでください。
7. 試薬が微生物に汚染されないよう注意してください。
8. 試薬の外観に変化が見られる、あるいはコントロール検体の測定結果に大きな変化がある場合には、試薬劣化の可能性が考えられますので使用しないでください。

本製品の正常な状態での外観は、淡黄色の透明な液体です。

貯法、有効期限、安定性

サイトスタット　J5-RD1 ：

冷暗所（2～8℃）　　製造後 18 箇月

包装単位

サイトスタット　J5-RD1

製品番号　6604120　容量 50 テスト（0.5mL）

主要文献

1. Ritz J, Pesando JM, Notis-McConarty J, Lazarus H, Schlossman SF: 1980. A monoclonal antibody to human acute lymphoblastic leukemia antigen. Nature 283 : 583.
2. Ritz J, Nadler LM, Bhan AJ, Notis-McConarty J, Pesando JM, Schlossman SF: 1981 . Expression of common acute lymphoblastic leukemia antigen (CALLA) by lymphomas of B-cell and T-cell lineage. Blood 48: 648.
3. Clavell LA, Lipton JM, Blast RC. Kudish M, Pesando JM, Schlossman SF, Ritz J: 1981. Absence of common ALL antigen on normal bipotent myeloid, erythroid and granulocytic progenitors. Blood 58 : 333.
4. Sallan SE, Ritz J, Pesando JM, Gelber R. O'Brien C, Hitchcock S, Coral FS, Schlossman SF: 1980. Cell surface antigens: Prognostic implication in childhood acute lymphoblastic leukemia. Blood 55 : 395.
5. Greaves MF: 1981. Monoclonal antibodies as probes for leukemic heterogeneity and hemopoetic differentiation. In: Leukemia Markers, ed. W. Knapp, Academic Press, p. 19.
6. Greaves MF: 1981. Biological basis of differential prognosis in immunologically defined sub-classes of acute lymphoblastic leukemia. In: Leukemia markers, ed. W. Knapp, Academic Press, p. 463.
7. Nadler LM, Ritz J, Todd RFIII. Griffin J, Reinherz EL, Schlossman SF: 1981. Diagnosis and treatment of human leukemia and lymphomas utilizing monoclonal antibodies. Progress in Hematology, ed. E. Brown, Grune and Stratton, Inc., NY., p. 187.
8. Cossman J, Neckers LM, Leonard WJ, Greene WC: 1983. Polymorphonuclear neutrophils express the common acute lymphoblastic leukemia antigen. J Exp Med 157 : 1064.
9. Hokland P, Ritz J, Schlossman SF, Nadler LM: 1985. Orderly expression of B cell antigens during the in vitro differentiation of nonmalignant human pre-B cells. J Immunol 135 : 1746.
10. Boucheix C, Perrot JY, Mirshahi M, Giannoni M, Billard F, Bernadou A, Rosenfeld C: 1985. A new set of monoclonal antibodies against acute lymphoblastic leukemia. Leuk res 9(5) : 597-604.
11. Boucheix C. Perrot JY, Mirshahi M, Bernadou A. Rosenfeld C: 1983. A rapid method for detection of membrane amtigens by Fluorescent microscopy and its application to screening hybridoma antibodies. J Immunol Methods 57 : 145-150.
12. Lebien WT, Mac. Cormach RT: 1989. The common acute lymphoblastic leukemia antigen (CD10). Emancipation from a functional Enigma. Blood 73(3) : 625-635.
13. Penchansky L, Pirrotta V, Kaplan SS: 1993. Flow cytometric study of the expression of neutral endopeptidase (CD10/CALLA) on the surface of newborn granulocytes. Mod Pathol 6:414-418.
14. Connelly JC. Chambless R, Holiday D, Chittenden K, Johnson AR : 1993. Up-regulation of neutral endopeptidase (CALLA) in human neutrophils by granulocyte-macrophage colony-

stimulating factor. J Leukoc Biol 53:685-690.
15. Taki T, Ida K, Bessho F, Hanada R, Kikuchi A, Yamamoto K, Sako M, Tsuchida M, Seto M, Ueda R, Hayashi Y: 1996. Frequency and clinical significance of the MLL gene rearrangemants in infant acute leukemia. Leukemia 10:1303-1307.
16. Heerema NA, Maben KD, Bernstein J. Breitfeld PP, Neiman RS, Vance GH: 1996. Dicentric (9;20)(p11;q11) identified by fluorescence in situ hybridization in four pediatric acute lymphoblastic leukemia patients. Cancer Genet Cytogenet 92:1 11-115.
17. Ganju RK. Shpektor RG, Brenner DG, Shipp MA:1996. CD10/neutral endopeptidase 24. 11 is phosphorylated by casein kinase ll and coassociates other phosphoproteins including the lyn src-related kinase. Blood 88:4159-4165.

**問い合わせ先

ベックマン・コールター株式会社

〒135-0063　東京都江東区有明三丁目５番７号　TOC 有明ウエストタワー

TEL：0120-566-730　　FAX：03-5530-2460

**製造販売元

ベックマン・コールター株式会社

〒135-0063　東京都江東区有明三丁目５番７号　TOC 有明ウエストタワー

BECKMAN COULTER

6604120_0911